

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-199488

(43)Date of publication of application : 27.07.1999

(51)Int.Cl.

A61K 31/70

A61K 9/127

(21)Application number : 10-002739

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 09.01.1998

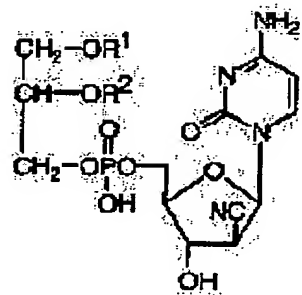
(72)Inventor : OKU NAOTO
SHUTO SATOSHI
MATSUDA AKIRA

(54) LIPOSOMED PREPARATION OF ANTITUMOR AGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a liposomed preparation administrable by intravenous injection, capable of efficiently delivering and accumulating an active component to a tumor tissue, having low side action and exhibiting excellent antitumor effect by including a specific compound as an active component.

SOLUTION: The objective preparation is produced by including a compound of formula (R1 and R2 are each palmitoyl) as an active component. The preparation preferably contains a lipid selected from palmityl glucuronide, cholesterol, dipalmitoyl phosphatidylcholine and dipalmitoyl phosphatidylglycerol as liposome-constituting lipid. As necessary, an additive such as α -tocopherol can be used as a lipid constituting component. In the case of using the preparation as an antitumor agent, the daily administration dose of the preparation for adult is preferably 1-500 mg of the compound of formula in one or several divided doses by intravenous injection or direct administration to the tumor tissue.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

21.12.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-199488

(43)公開日 平成11年(1999) 7月27日

(51)Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/70
9/127

識別記号

ADU

F I

A 6 1 K 31/70
9/127

ADU

L

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平10-2739

(22)出願日 平成10年(1998) 1月9日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年7月10日
発行の「Drug Delivery System
Vol. 12, No. 4」に発表

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 奥 直人

静岡県清水市川原町21-11-302

(72)発明者 周東 智

北海道札幌市西区八軒1条西4丁目616-14

(72)発明者 松田 彰

北海道札幌市北区北24条西12丁目1-7-501

(74)代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 抗腫瘍薬のリポソーム化製剤

(57)【要約】

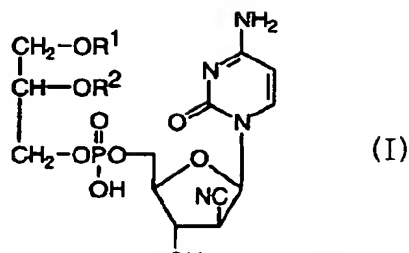
【課題】本発明は、抗腫瘍薬である5'-ジパルミトイル
ルフォスファチジル-2'-C-シアノ-2'-デオキシ
シーβ-D-アラビノフラノシルシトシンを含有するリ
ポソーム化製剤を提供する。

【解決手段】5'-ジアシルルフォスファチジル-2'-
C-シアノ-2'-デオキシシーβ-D-アラビノフラノ
シルシトシンを有効成分として含有し、リポソーム構成
成分としてコレステロール、ジパルミトイルホスファチ
ジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロー
ル、パルミチルグルクロニドから選択される脂質を含有
するリポソーム化製剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】式

【化1】



【式中、 R^1 及び R^2 はパルミトイル基を示す。】で表わされる化合物を有効成分として含有するリポソーム化製剤。

【請求項2】請求項1に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質としてパルミチルグルクロニド (PGlcUA) を含有することを特徴とするリポソーム化製剤。

【請求項3】請求項1に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質としてコレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、パルミチルグルクロニド (PGlcUA) から選択される脂質を含有することを特徴とするリポソーム化製剤。

【請求項4】請求項1に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質が化合物 (I) のみであることを特徴とするリポソーム化製剤。

【請求項5】請求項1に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質が化合物 (I)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) であることを特徴とするリポソーム化製剤。

【請求項6】請求項1に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質が化合物 (I)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびパルミチルグルクロニド (PGlcUA) であることを特徴とするリポソーム化製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、5'-ジパルミトイルフォスファチジル-2'-C-シアノ-2'-デオキシ-1-β-D-アラビノフラノシルシトシンを効率的に腫瘍組織に蓄積させることにより抗腫瘍活性を増大させたリポソーム化製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ピリミジンヌクレオシド誘導体である2'-C-シアノ-2'-デオキシ-1-β-D-アラビノフラノシルシトシン (以下CNDAC) およびそのN⁴-アシル又は5'-ジアシルフォスファチジル誘導体は優れた

抗腫瘍活性を有する (特開平4-235182号、特開平5-194497号、特開平7-179491号参照)。しかし、経口投与や溶液の注射などの従来汎用されてきた方法にて抗癌薬を投与すると一般的に全身へと分布し、投与した抗癌薬物の内のごく一部しか腫瘍組織には到達しないことになり、目的とする制癌効果を効率的に発現することが困難となる。同時に、多くの抗癌薬はその殺細胞効果が癌細胞だけではなく正常細胞にも働き得る。よって従来の方法による投与からは、造血組織や消化管内皮などの細胞の増殖の盛んな正常組織に副作用が発現することが多かった。また、この状況はCNDACおよびその誘導体についても基本的には同様である。

【0003】一般的に腫瘍組織近傍の血管は正常組織の血管より物質透過性が高いため、高分子量の化合物やリポソーム等の微粒子を血管内に巡らせることができれば、それらは該組織にのみ選択的に漏出することが知られている (Y. Matsumuraら、Cancer Res. 46, 6387-6392 (1986) / D. D. Lasic と F. Martin (編)、*Stealth Liposomes*、CRC Press、pp119-126 (1995) 参照)。また、腫瘍部位においてはリンパ組織が未発達であるため、漏出したこれらの物質は組織から排出されにくい。 (Y. Matsumuraら、Cancer Res. 46, 6387-6392 (1986) 参照)。従って、高分子や微粒子に薬物を担持させて血流中を巡らせることが出来れば腫瘍組織へ薬物を選択的に集積させることが可能となる。その結果、制癌効果の効率的な発現と、正常組織での副作用が抑制されることが期待される。

【0004】リポソームは、生体適合性に優れ、物性の異なる種々の化合物を包含することができ、表面物性やサイズ等の制御により高い血中滞留性が得られる、等の点から、薬物のキャリアーとしてしばしば利用される (D. D. Lasic、*Liposomes: from basic to applications*、Elsevier Science Publishers、pp. 261-471 (1993) 参照)。しかしながら、實際上単位脂質量当たりには包含される薬物量が少量に限られ実用的でないなどの問題点があり、これまで抗腫瘍剤としてはドキソルビシンのリポソーム化製剤等の数少ない成功例しかない (D. D. Lasic、Nature 380, 561-562 (1996) 参照)。すなわち脂溶性薬物の場合、通常では包含可能な薬物は全脂質モル数に対し3mol%程度が限界であり (Moriら、Pharm. Res. 10, 507-514 (1993) 参照)、治療上必要な量が投与できず実用化された例はない。また一方水溶性薬物の場合には、リポソーム調製のために使用した全薬物量のうち実際にリポソームに含有させることのできる割合が通常高々50%程度であることから、実用的には大きな問題が存在するといえる (D. D. Lasic、*Liposomes: from basic to applications*、Elsevier Science Publishers、pp. 63-107 (1993) 参照)。上記のドキソルビシンは水溶性の薬物であるが、リモートローディングという包含操作が可能な特殊な物性を有するた

め (Tardiら、J. Drug Targeting、4(3)、129-140 (1996) 参照) 使用した薬物のうちのリポソームへ包含される割合を高くすることができる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 このように、CNDACあるいはその誘導体を静脈内投与することにより効率的に腫瘍組織へ蓄積させ抗腫瘍効果が効率的に発揮できる製剤が求められていた。

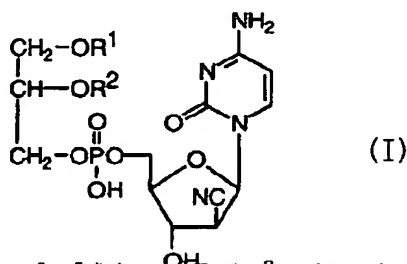
【0006】 発明者等は、CNDACの5'-ジアシルフォスファチジル誘導体はリポソームに極めて包含されやすく、該誘導体単独でもリポソームの形成が可能であることを見出すとともに、該リポソーム化製剤を静脈内投与することによりCNDAC誘導体を腫瘍組織へ選択的に蓄積させ、副作用の少ない優れた抗腫瘍効果が得られることを見出し本発明を完成した。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明は、(1) 式

【0008】

【化2】



【0009】 [式中、 R^1 及び R^2 はパルミトイル基を示す。] で表わされる化合物を有効成分として含有するリポソーム化製剤、(2) (1) に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質としてパルミチルグルクロニド (PGlcUA) を含有することを特徴とするリポソーム化製剤、(3) (1) に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質としてコレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、パルミチルグルクロニド (PGlcUA) から選択される脂質を含有することを特徴とするリポソーム化製剤、(4) (1) に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質が化合物 (I) のみであることを特徴とするリポソーム化製剤、(5) (1) に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質が化合物 (I)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) であることを特徴とするリポソーム化製剤、(6) (1) に記載されたリポソーム化製剤において、リポソーム構成脂質が化合物 (I)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびパルミチルグルクロニド (PGlcUA) である

ことを特徴とするリポソーム化製剤、からなる。

【0010】 本発明において、「リポソーム」とは、当業者周知の通り (D.D.Lasic、*「liposomes: from basic to applications」*、Elsevier Science Publishers、p. 1-171 (1993) 参照。)、疎水部分をお互いに内側に向けた2分子膜状に集合した脂質および内部の水相から構成される閉鎖小胞を意味する。

【0011】 「リポソーム化製剤」とは、内部に薬物を包含させたリポソームの水中分散型製剤を意味し、該薬物はリポソームを構成する膜状に集合した脂質相に包含されていてもよくリポソーム内部の水相に包含されていてもよい。

【0012】 本発明において使用するリポソームの直径 (「体積平均粒子径」) としては、静脈内投与後の血中滞留性および/または腫瘍組織への集積性が高い50乃至400nmが望ましく、より好適には50乃至200nmである (A.L.Klibanovら、*Biochim. Biophys. Acta* 1062、142-148 (1991) 及びD.D.Lasic、*「liposomes: from basic to applications」*、Elsevier Science Publishers、pp. 261-471 (1993) 参照)。リポソームの「体積平均粒子径」は、動的光散乱法等の原理に基づき求めることができる (D.D.Lasic、*「liposomes: from basic to applications」*、Elsevier Science Publisher s、pp. 1-171 (1993) 参照)。

【0013】 本発明のリポソーム化製剤を構成する脂質としては、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、パルミチルグルクロニド (PGlcUA) を挙げることができ、上記から選択される任意の脂質を任意の割合で混合して使用することができる。

【0014】 また、必要に応じて抗酸化作用等を目的として、 α -トコフェロール等の添加物を脂質構成成分として使用することができる。

【0015】 本発明のリポソーム化製剤の有効成分である化合物 (I) は分子内に脂溶性部分と親水性部分を有するので、化合物 (I) 自体が脂質として働きリポソームを構成することができる。さらに、化合物 (I) 単独でリポソームを構成することもできる。

【0016】 なお、化合物 (I) は、薬理上許容される塩として使用することができ、そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩等の金属塩、及びグアニジン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩のような有機塩基を挙げることができる。また、化合物 (I) は水和物として使用することもできる。

【0017】 リポソーム内部を構成する水相には、通常、塩化ナトリウム水溶液、緩衝液 (リン酸緩衝液、酢酸緩衝液等)、単糖類もしくは二糖類の水溶液 (グルコ

ース水溶液、トレハロース水溶液等)を使用することができる。

【0018】本発明のリポソーム化製剤を構成する化合物(I)および脂質の好適な組成は以下のとおりである。

【0019】(組成A)化合物(I)のみ

(組成B)化合物(I)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)

配合比は特に制限されないが、2/2/2/1(モル比)が好ましい。

【0020】(組成C)化合物(I)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、パルミチルグルクロニド(PGlcUA)

配合比は特に制限されないが、2/2/2/1(モル比)が好ましい。

【0021】

【発明の実施の形態】リポソームは、当業者周知の方法(D.D.Lasic、「liposomes: from basic to application」, Elsevier Science Publishers, pp.1-171 (1993) 参照。)に従い製造し、サイズを調節することができる。すなわち、上記で選ばれた脂質および塩化ナトリウム水溶液、緩衝液、グルコース水溶液等を用い、薄膜法、逆相蒸発法、エタノール注入法、エーテル注入法、脱水-再水和法等により製造でき、超音波照射法、凍結融解後の超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法等の方法によりサイズが調節できる。本発明においても、これらの方法に従いリポソームを製造し、必要に応じてリポソームのサイズを調節する。

【0022】また、リポソーム化製剤中の薬物濃度は製造時における薬物の配合量のほか、製造後に超遠心分離等の濃縮工程または塩化ナトリウム水溶液等による希釈工程を挿入することにより適宜調節することができる。本発明のリポソーム化製剤の場合、1乃至200mg/mLの化合物(I)を包含するように薬物濃度を調節することができる。

【0023】化合物(I)のように脂溶性が高い化合物は、該化合物を脂質の1成分とみなして他の脂質と混合しリポソームを製造することにより、リポソームに包含させることができる(D.D.Lasic、「liposomes: from basic to applications」, Elsevier Science Publishers, pp.261-471 (1993) 参照。)。或は、化合物(I)自体が脂質として働きリポソームを構成することもできる。

【0024】期待通り脂溶性化合物がリポソーム内に包含されているか、あるいはリポソームから独立して凝集塊を形成し分散しているか、厳密に判断することは困難

・処方例1(化合物(I)リポソーム)

であるが、エクストルージョンの可否およびエクストルージョン後の化合物の回収率から推定することができる。すなわち、エクストルージョン法によるサイズ調節時には、分散液が50乃至400nm程度の細孔を通過するが、脂溶性薬物の凝集塊はこの細孔を通過することができず目詰まりを起こしエクストルージョンが不可能となる(Moriら、Pharm. Res. 10, 507-514 (1993) 参照。))。

【0025】本発明のリポソーム化製剤を抗腫瘍剤として使用する場合、その投与量は、症状、年齢、および、製剤中に含有される有効成分(化合物(I))の量によって異なるが、例えば、成人に対して1日あたり、化合物(I)として0.1mg(好適には1mg)乃至2000mg(好適には500mg)に相当する製剤を1回または数回にわけて静脈内または直接腫瘍組織に投与することができる。また、治療に最適な化合物(I)の有効量を維持するために、連続的に投与することもできる。

【0026】

【実施例】以下、実施例および試験例により本発明をさらに詳細に説明する。なお、本製剤の有効成分である化合物(I)の製造は特開平7-179491号記載の方法に従った。

【0027】[実施例1] 化合物(I)を包含したリポソームの製造

5'- (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ)-2'-C-シアノ-2'-デオキシ-β-D-アラビノフラノシルシトシン(化合物(I)、特開平7-179491号の実施例1の化合物)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、パルミチルグルクロニド(PGlcUA)、およびpH7.4リン酸緩衝生理食塩液を使用し、Banghamら(J. Mol. Biol. 8, 660-668 (1964) 参照。)の方法によりリポソームの粗分散液を得た。すなわち、下記処方の脂質をナス型フラスコに入れ、適量のクロロホルムを加えた。減圧下、クロロホルムを留去し、ナス型フラスコの底に脂質薄膜を形成させ、リン酸緩衝生理食塩液で水和させた後、凍結融解を3回行なった。

【0028】この粗分散液をバス型ソニケーターにて10分間超音波処理を行なった。さらにエクストルージョンを用いて、上に400nmと下に200nmのポリカーボネート膜を重ねて3回、100nmの膜を3回通すことにより粒径の制御を行った。

【0029】処方例1乃至3に各成分の配合量及び配合比(モル比)を示す。それぞれ化合物(I)濃度が6.37mMとなるように製造した。

【0030】

成分	配合量	配合比（モル比）
化合物（I）	6.37 mM	1
・処方例2（DPPGリポソーム）		
成分	配合量	配合比（モル比）
化合物（I）	6.37 mM	2
DPPC	6.37 mM	2
コレステロール	6.37 mM	2
DPPG	3.19 mM	1
・処方例3（PGlcUAリポソーム）		
成分	配合量	配合比（モル比）
化合物（I）	6.37 mM	2
DPPC	6.37 mM	2
コレステロール	6.37 mM	2
PGlcUA	3.19 mM	1

【比較例1】 中性界面活性剤による化合物（I）の可溶化

医薬品添加物として静脈内投与可能な中性界面活性剤であるポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60により化合物（I）の水溶液中への溶解性改善を試みたが、化合物（I）を1 mg/mL可溶化するのに必要なポリオキシエチレン硬化ヒマシ油の濃度は、50 mg/mL以上と極めて高かった。

【0031】この結果から、静脈投与による治療に要する濃度の化合物（I）を、毒性が問題にならない量の界面活性剤にて可溶化することが不可能であることがわかった。

【0032】【試験例1】 化合物（I）のリポソームへの包含性

（1）実施例1の処方例1で使用した成分は化合物（I）のみである。これを実施例1に記載の方法で処理したときに、エクストルージョン操作は容易に実施できた。もし化合物（I）がリポソームの形態をとらず単なる分散懸濁塊を構成しているとすると孔径100 nmの膜を通過させることは極めて困難であることから、処方1にて化合物（I）はリポソームになっていると考えられた。

【0033】（2）実施例1での処方例1、2および3にて調製されたリポソームを遠心分離にて回収し、これに界面活性剤還元型トライトンX100を1%になるように添加してリポソームを破壊し可溶化した。この液の0.1規定塩酸中での280 nmにおける紫外線吸光度を分光光度計を用いて測定し化合物（I）濃度を決定し

た。その結果、リポソーム調製操作時に配合した化合物（I）の全量がりポソーム中に回収されていることが分かった。すなわち、処方例1、2および3における化合物（I）のリポソームへの組み込み率は100%であった。

【0034】【試験例2】 リポソームによる抗腫瘍効果の検討

実験動物として雄性のBALB/cマウスの5週齢（日本SLC）のものをを用いた。Meth A sarcomaの 1×10^6 cells/mouseをマウスの左腹側部に皮下移植し胆癌マウスを得た。Meth A sarcoma移植後6日、10日、14日後の胆癌マウスに実施例1の処方例1乃至3に示した各製剤をそれぞれ0.2 ml/mouse/day尾静脈内投与した。この際の化合物（I）の投与量は1日あたりマウスの体重1 kg当たり50 mgとした。また対照群のマウスには製剤とほぼ同じ体積の生理食塩液を尾静脈内投与した。抗腫瘍効果の観測として、移植6日後から腫瘍の増殖、副作用として体重変化、及び生存日数を調べた。なお、腫瘍の容積はその短径および長径の積より求めたが、これより算出される腫瘍容積は腫瘍を摘出して実測する腫瘍重量と極めて高い相関性を示すことが明らかとなっている。なお、各投与群には12匹の胆癌マウスを用いて実験を行なった。

【0035】腫瘍の増殖結果を図1に、また各群の生存曲線を図2に示した。

【0036】図1より、実施例1の処方例1、2および3の化合物（I）含有リポソーム製剤の投与により生理食塩液投与群に比べ腫瘍の増殖が抑えられたことが分か

る。図2からは、処方例1、2および3の化合物(Ⅰ)含有リポソーム製剤の投与によって生理食塩液投与群に比べて生存曲線は延命の方向にシフトしたことが分かる。

【0037】これらの結果より、実施例1の各処方による顕著な抗腫瘍効果が示された。なかでも処方例3のPG1cUA配合処方(グルクロン酸修飾リポソーム)は血中滞留性が高く、腫瘍組織への移行集積性が特に優れ、最高の抗腫瘍効果を示した。グルクロン酸修飾により、リポソームの細網内皮系(RES)による捕獲が回避されたためと考えられる。

【0038】また、毒性の指標として体重変化を観測したが、実施例1の各処方投与時に一過性に減少が見られたもののその後速やかに回復したことより、これらのリポソーム製剤の毒性は弱いことが示された。

【0039】

【発明の効果】本発明において、CNDACの5⁻-ジ

パルミトイルフォスファチジル誘導体である化合物(Ⅰ)を高濃度に包含するリポソーム化製剤が得られた。

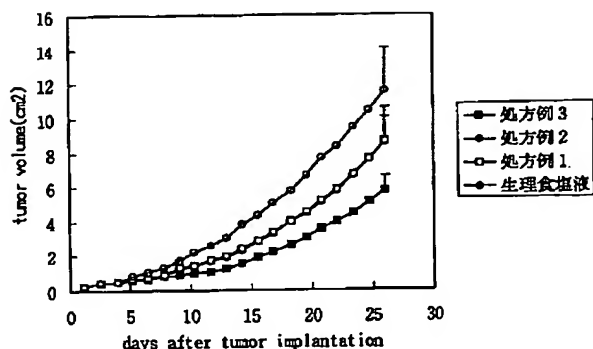
【0040】本発明における化合物(Ⅰ)のリポソーム化製剤は、化合物(Ⅰ)の静脈内投与を可能とし、化合物(Ⅰ)を効率的に腫瘍組織に送達し蓄積させることを可能とする製剤として有用性が高い。なかでもグルクロン酸で修飾された脂質(PG1cUA)をリポソーム構成成分として配合することにより、化合物(Ⅰ)の血中滞留性を高め、腫瘍組織へ選択的に送達し蓄積させることが可能となり、その結果として、副作用が少なく、かつ、優れた抗腫瘍効果を有する有用な製剤を得ることができた。

【図面の簡単な説明】

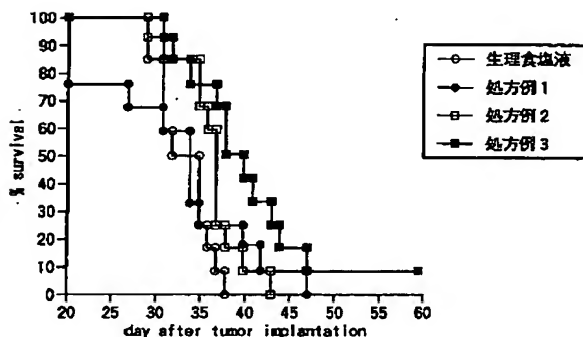
【図1】腫瘍体積の経時変化

【図2】生存曲線

【図1】



【図2】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.